

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
03 December 1999 (03.12.99)

International application No.	Applicant's or agent's file reference
PCT/EP99/02278	RE/B45139
International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
29 March 1999 (29.03.99)	09 April 1998 (09.04.98)

Applicant
FRIEDE, Martin et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

30 October 1999 (30.10.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  F. Baechler
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>RE/B45139</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. <b>PCT/EP 99/02278</b>	International filing date (day/month/year) <b>29/03/1999</b>	(Earliest) Priority Date (day/month/year) <b>09/04/1998</b>
Applicant <b>SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. et al.</b>		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

## 1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

contained in the international application in written form.

filed together with the international application in computer readable form.

furnished subsequently to this Authority in written form.

furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2.  Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3.  Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the **title**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established by this Authority to read as follows:

**ADJUVANT COMPOSITIONS**

5. With regard to the **abstract**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

as suggested by the applicant.

because the applicant failed to suggest a figure.

because this figure better characterizes the invention.

None of the figures.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02278

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

**Remark:** Although claims 21-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02278

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Remark:** Although claims 21-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece		Republic of Macedonia	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon		Republic of Korea	PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/02278

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category <sup>o</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9336 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 93-285369 XP002114794 &amp; JP 05 201877 A (KANEBO LTD), 10 August 1993 (1993-08-10) abstract</p> <p>---</p>	1-7, 9-21, 24-27
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9429 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A97, AN 94-238671 XP002114795 &amp; JP 06 172216 A (NORINSUISANSHO KACHIKU EISEI), 21 June 1994 (1994-06-21) abstract</p> <p>---</p> <p>---</p>	1-6,8, 11-27

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

9 September 1999

20/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fernandez y Branas, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/02278

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 19781 A (ALEXANDER JAMES ;BREWER JAMES MACDONALD (GB); PROTEUS MOLECULAR DE) 14 October 1993 (1993-10-14) page 2, line 15 - page 4, line 13 ---	1-7,9-27
X	WO 95 09651 A (PROTEUS MOLECULAR DESIGN / ;ALEXANDER JAMES (GB); BREWER JAMES MACDO) 13 April 1995 (1995-04-13) cited in the application page 1, line 30 - page 2, line 7 page 5, line 30 - page 6, line 26 page 12, line 15 - line 23 ---	1-7,9-27
X	WO 94 17827 A (LYFJATHROUN H F ;STATENS SERUMINSTITUT (DK); GIZURARSON SVEINBJOER) 18 August 1994 (1994-08-18) cited in the application page 8, line 24 - page 10, line 17 ---	1-6,8, 11-27
X	US 3 919 411 A (CARLSON JR ARTHUR ET AL) 11 November 1975 (1975-11-11) column 6, line 17 - column 7, line 33 column 17 - column 18 claims 1-11 ---	1-21, 24-27
A	WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) / 1 February 1996 (1996-02-01) cited in the application the whole document ---	1-27
A	WO 88 06882 A (MICRO VESICULAR SYSTEMS) / 22 September 1988 (1988-09-22) cited in the application the whole document -----	1-27

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02278

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 5201877	A	10-08-1993	NONE	
JP 6172216	A	21-06-1994	NONE	
WO 9319781	A	14-10-1993	AT 158185 T AU 3899793 A CA 2132547 A CN 1085449 A DE 69314020 D DE 69314020 T EP 0634937 A FI 944676 A HU 69935 A JP 2690620 B JP 7505389 T NO 943739 A NZ 251402 A US 5679355 A ZA 9302491 A	15-10-1997 08-11-1993 14-10-1993 20-04-1994 23-10-1997 06-08-1998 25-01-1995 06-10-1994 28-09-1995 10-12-1997 15-06-1995 05-10-1994 28-10-1996 21-10-1997 02-11-1993
WO 9509651	A	13-04-1995	AU 7789194 A EP 0722341 A JP 9503224 T US 5876721 A ZA 9407828 A	01-05-1995 24-07-1996 31-03-1997 02-03-1999 18-05-1995
WO 9417827	A	18-08-1994	AU 668290 B AU 6106594 A CA 2156084 A EP 0682528 A JP 9508614 T NO 953182 A	26-04-1996 29-08-1994 18-08-1994 22-11-1995 02-09-1997 12-10-1995
US 3919411	A	11-11-1975	US 3790665 A	05-02-1974
WO 9602555	A	01-02-1996	AU 1912795 A CA 2194761 A EP 0772619 A JP 10506265 T	16-02-1996 01-02-1996 14-05-1997 23-06-1998
WO 8806882	A	22-09-1988	US 4917951 A AT 71292 T AT 71289 T AT 69723 T AU 605581 B AU 1541688 A AU 603659 B AU 1543888 A AU 603447 B AU 1683688 A CA 1289420 A CA 1311415 A CA 1289419 A DE 3866544 A DE 3867635 A DE 3867637 A DK 633188 A DK 633388 A	17-04-1990 15-01-1992 15-01-1992 15-12-1991 17-01-1991 10-10-1988 22-11-1990 10-10-1988 15-11-1990 10-10-1988 24-09-1991 15-12-1992 24-09-1991 09-01-1992 20-02-1992 20-02-1992 11-11-1988 11-11-1988

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02278

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8806882	A	EP 0349579 A	10-01-1990
		EP 0352282 A	31-01-1990
		EP 0349593 A	10-01-1990
		JP 2502794 T	06-09-1990
		JP 2617346 B	04-06-1997
		JP 2502094 T	12-07-1990
		JP 2589173 B	12-03-1997
		JP 6000193 B	05-01-1994
		JP 2503646 T	01-11-1990
		KR 9609647 B	23-07-1996
		NZ 223843 A	26-04-1990
		US 4855090 A	08-08-1989
		WO 8806881 A	22-09-1988
		WO 8806883 A	22-09-1988
		US 4911928 A	27-03-1990
		US 5474848 A	12-12-1995
		US 4942038 A	17-07-1990
		US 5023086 A	11-06-1991
		US 5000960 A	19-03-1991
		US 5628936 A	13-05-1997
		US 5219538 A	15-06-1993
		US 5234767 A	10-08-1993
		ZA 8801763 A	12-09-1988
		US 5147723 A	15-09-1992

## PATENT COOPERATION TREATY

09/647518-16

REC'D 05 JUL 2000

PCT

I TO

PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference RE/B45139	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP99/02278	International filing date (day/month/year) 29/03/1999	Priority date (day/month/year) 09/04/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/39		
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. et al.		
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 5 sheets.</p>		
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>		

Date of submission of the demand 30/10/1999	Date of completion of this report 03.07.2000
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Moreno de Vega, C Telephone No. +49 89 2399 7486



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP99/02278

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

**Description, pages:**

1-30 as originally filed

**Claims, No.:**

1-37 with telefax of 19/05/2000

### **Drawings, sheets:**

1-12 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- the description, pages:
- the claims, Nos.:
- the drawings, sheets:

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c));

4. Additional observations, if necessary:

### III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.  
 claims Nos. 32-34.

because:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP99/02278

the said international application, or the said claims Nos. 32-34 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

**see separate sheet**

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for the said claims Nos. .

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims 2-36
	No:	Claims 1, 37
Inventive step (IS)	Yes:	Claims 2-17, 19-36
	No:	Claims 1, 18, 37
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims 1-31, 35-37
	No:	Claims

2. Citations and explanations

**see separate sheet**

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

**see separate sheet**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP99/02278

Reference is made to the following documents:

- D1: DATABASE WPI Section Ch, Week 9336 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 93-285369 XP002114794 & JP 05 201877 A (KANEBO LTD), 10 August 1993 (1993-08-10)
- D2: WO 94 17827 A (LYFJATHROUN H F ;STATENS SERUMINSTITUT (DK); GIZURARSON SVEINBJOER) 18 August 1994 (1994-08-18) cited in the application
- D3: US-A-3 919 411 (CARLSON JR ARTHUR ET AL) 11 November 1975 (1975-11-11)

**Re Item III**

**Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

Claims 32-34 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

**Re Item V**

**Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. D1 (see Abstract) describes adjuvant compositions with high adjuvant activity comprising polyoxyethylene alkyl ethers or phosphoric acid salts thereof which fall into the general formula of claim 1, an acrylic acid polymer, considered as an excipient, and water, having thus an aqueous solution of the adjuvant with an excipient. This document appears to be novelty destroying for claim 1.

D2 (see page 1 lines 4-9, page 8 line 24 to page 10 line 17) discloses formulations for the topical administration of antigens or vaccines to mammals via mucosal membranes, comprising one or more adjuvants, e.g.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP99/02278

polyoxyethylene sorbitan monoesters, polyoxyethylene glycerol triesters and caprylic/capric acid glycerides in an amount of 0,01 to 15%(v/v)(see claim1). The adjuvants used differ from the alkyl adjuvants of the present invention.

D3 (see column 6 line 17 - column 7 line 33 and claims 1-11) discloses medical compositions comprising an injectable active substance or agent combined with an adjuvant, capable of enhancing the effect of the agent. Said adjuvant includes a polymer of acrylic acid cross-linked with polyallyl sucrose and an emulsion system including a water and oil emulsion carrier with a surfactant in an amount of 1-20 % by volume. This document appears to be novelty destroying for claim 37.

Thus, claims 1 and 37 do not meet the requirements of Article 33(2) PTC.

2. D2, considered to be the most relevant prior art, differs from the present claims 2-17, 19-36 in that other polyoxyethylene derivatives, namely alkyl ethers and other esters, are used. The technical problem to be solved by the present application is the provision of alternative adjuvant compositions, well tolerated in humans and potent in their induction of systemic immune responses, for use in mucosal vaccine formulations. The solution proposed by claims 2-17, 19-36 appear to be inventive: there is no indication in the prior art which suggests the advantages of using the adjuvant composition of these claims in the preparation of vaccines for mucosal via.

Claim 18 is obvious over D1 and the general knowledge in the field, as the immunostimulants cited are already known. Thus, claim 18 does not meet the requirements of Article 33(3).

3. For the assessment of the present claims 32-34 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP99/02278

for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

**Re Item VII**

**Certain defects in the international application**

1. Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in the documents D1 and D3 is not mentioned in the description, nor are these documents identified therein.
2. There are two claims numbered as claim 20. The second one has been renumbered by this Examining Authority as 20(a) for the shake of clarity.



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  C12N 1/04, 7/00, A61K 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/02522</b>  (43) Date de publication internationale: 22 janvier 1998 (22.01.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01308</p> <p>(22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/08851 16 juillet 1996 (16.07.96) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et</p> <p>(75) Inventeur/Déposant (<i>US seulement</i>): SENE, Claude [FR/FR]; 12, rue Foch, F-67190 Mutzig (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Publiée</b>  <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>  <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR PRESERVING INFECTIOUS RECOMBINANT VIRUSES, AQUEOUS VIRAL SUSPENSION AND USE AS MEDICINE</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE CONSERVATION DE VIRUS RECOMBINANTS INFECTIEUX, SUSPENSION AQUEUSE VIRALE ET UTILISATION COMME MEDICAMENT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention discloses a method for preserving infectious recombinant viruses in frozen or liquid form, in which the viruses are preserved in an aqueous solution containing saccharose at a concentration higher than 0.75 M, preferably between 0.75 and 1.5 M, or more preferably at a concentration of 1 M, and an aqueous viral suspension and its use as medicine.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne un procédé de conservation de virus recombinants infectieux sous forme congelée ou liquide, dans lequel les virus sont conservés dans une solution aqueuse comprenant du saccharose à une concentration supérieure à 0,75 M, de préférence comprise entre 0,75 M et 1,5 M, plus préférentiellement encore à une concentration égale à 1 M, ainsi qu'une suspension aqueuse virale et son utilisation comme médicament.</p>			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettland	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Sabée		
DK	Danemark	LR	Liberia	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE CONSERVATION DE VIRUS RECOMBINANTS INFECTIEUX,  
SUSPENSION AQUEUSE VIRALE ET UTILISATION COMME MEDICAMENT

L'invention concerne un procédé de conservation de virus  
5 recombinants infectieux, une suspension aqueuse virale, et son utilisation  
comme médicament.

Les virus vivants ont de nombreuses applications, en particulier  
comme vaccins. Ce sont des particules qui possèdent un génome sous forme  
d'ADN ou d'ARN contenant les informations utiles à leur replication, mais qui  
10 ont besoin d'infecter une cellule hôte pour réaliser la synthèse des protéines  
qui leur sont nécessaires.

Par ailleurs, la possibilité d'intégrer dans un génome de virus du  
matériel génétique étranger a permis de créer des virus dits recombinants  
portant un gène d'intérêt thérapeutique utilisés pour transférer ce gène  
15 dans des cellules spécifiques de patients déficients. C'est le principe de la  
thérapie génique.

La possibilité de traiter les maladies humaines par thérapie  
génique est passée en quelques années du stade des considérations théoriques  
à celui des applications cliniques. La grande majorité des protocoles décrits  
20 jusqu'à présent met en oeuvre des vecteurs viraux pour transférer et  
exprimer le gène thérapeutique dans les cellules à traiter.

A ce jour, les vecteurs rétròviraux sont parmi les plus utilisés du  
fait de la simplicité de leur génome, bien qu'ils présentent une capacité de  
clonage assez restreinte.

25 Les adénovirus, quant à eux, offrent plusieurs avantages qui en  
font des vecteurs de choix pour une grande variété d'applications. En effet,  
ils infectent de nombreux types cellulaires, sont non-intégratifs, peu  
pathogènes et peuvent se repliquer dans les cellules en division ou  
quiescentes. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN  
30 linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb portant plus d'une trentaine de  
gènes, à la fois des gènes précoces nécessaires à la replication virale (E1 à E4 ;  
E pour early, signifiant précoce en anglais) et des gènes tardifs de structure  
(L1-L5 ; L pour late, signifiant tardif en anglais).

35 Les vecteurs adénoviraux recombinants utilisés à des fins de  
thérapie génique sont déficients pour la replication afin d'éviter leur  
dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. D'une manière  
générale, ils sont dépourvus de la majorité de la région E1 et certains

d'inflammation liés à l'expression des gènes viraux restants. Ils ne peuvent être propagés que par transcomplémentation des fonctions adénovirales pour lesquelles ils sont déficients. A l'heure actuelle, on utilise essentiellement la lignée de complémentation 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72) 5 ou des lignées en dérivant (Yeh et al., 1996, J. Virol. 70, 559-565 ; Wang et al., 1995, Gene Therapy 2, 775-783 ; Krougliak et Graham, 1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586).

Les adénovirus sont notamment utilisés dans le cas du traitement de la mucoviscidose par thérapie génique (Pavirani et al., 1996, médecine / 10 sciences 12, 25-33).

Les virus recombinants ne sont cependant utilisables que si leur viabilité et leur infectuosité ont été convenablement préservés pendant toute la période de stockage.

Traditionnellement, les adénovirus purifiés sont conservés dans 15 une solution saline contenant du glycérol de 10 à 30 % (Graham et al., 1991, Methods in Molecular Biology, vol. 7, chap. 11, p. 109-127 ; Ed Murrey, The Human Press Inc. ; Precious et Russel, Virology, a Practical Approach, 1985, chap. 9, p. 193-205 ; ed : BW Mahy, IRL Press, Washington DC ; Kanegae et al., Jpn. J. Med. Sci. Biol., 47, 157-166, 1994 et Green et al., Methods in enzymology, vol. LVIII, p. 425-435). Cependant, le glycérol présente l'inconvénient d'être 20 irritant pour l'épithélium pulmonaire, ce qui peut être délicat dans le cadre d'une administration intratrachéale et intrapulmonaire (par exemple pour le traitement de la mucoviscidose ou de cancers des voies pulmonaires). De plus, si cette solution permet la conservation des adénovirus sous forme congelée, 25 elle ne permet pas de maintenir leur activité à + 4°C au-delà d'une semaine.

L'addition de sucre à faible concentration (1 à 5 %) dans une solution saline a également été décrite (Precious et al., voir ci-dessus ; Huyghe et al., Human Gene Therapy 6:1403-1416, Novembre 1995, et Hehir, Process Development and Production Issues for Viral Vectors & Vaccines, The 30 Williamsburg Bio Processing Conference, 2nd annual meeting, 6-9 Novembre 1995) permettant une stabilité des adénovirus à long terme sous forme congelée, mais seulement à court terme à + 4°C (Hehir, voir ci-dessus).

La conservation des virus sous forme congelée posant des problèmes de stockage et de transport, il a également été envisagé de 35 préserver les virus et les vaccins viraux sous une forme lyophilisée. Cependant, cette technique présente l'inconvénient d'entraîner souvent une

perte de l'activité virale. Pour pallier cela, l'addition d'excipients comme les sucres (sucrose, glucose, tréhalose), permet de maintenir l'activité virale sous forme lyophilisée (WO 95/10601 - Viagene et EP-0 357 709 - Quadrant). L'emploi du lactose ou du saccharose à faible concentration (2,5 - 5 %) pour la 5 préservation du virus vivant atténué sous forme lyophilisée a également été préconisée (JP-88 555465 - Kitasako Inst.).

Aucune des solutions proposées jusqu'à présent n'a permis de maintenir l'activité des adénovirus à des niveaux satisfaisants pendant plus de 6 mois, tout en évitant les problèmes secondaires tels que les problèmes 10 d'irritation.

La présente invention remédié aux inconvénients de l'art antérieur. Elle a pour objet un procédé de conservation à long terme de virus recombinants infectieux tant sous forme liquide que sous forme congelée, dans lequel les virus recombinants sont conservés dans une solution aqueuse 15 comprenant du saccharose à haute concentration.

En effet, si l'utilisation du saccharose à haute concentration est connue depuis longtemps pour conserver les protéines ou autres produits biologiques (Timasheef et al., In Protein Structure, a Practical Approach, 1989, Ed Creighton, chap. 14, p. 331-345, IRL Press, Oxford, et Doebbler, 20 Cryobiology, vol. 3, N° 1, 1966) ou pour la cryopréservation des cellules vivantes dans l'azote liquide (Grout et al., Tibtech, Octobre 1990, vol. 8, p. 293-297), elle n'a jamais été proposée pour la conservation des virus.

Or, les résultats obtenus par la mise en oeuvre du procédé selon l'invention ont démontré un effet cryoprotecteur du saccharose à différentes 25 températures de stockage (- 80 °C, - 40°C, - 20°C et + 4°C) et ceci d'autant plus que la concentration en saccharose est élevée.

Avantageusement, les virus recombinants infectieux concernés par la présente invention sont des poxvirus, des adénovirus, des virus associés aux adénovirus et des rétrovirus.

Dans le cadre de l'invention, les virus sont conservés dans une 30 solution aqueuse comprenant du saccharose à haute concentration, c'est-à-dire à une concentration supérieure à 0,75 M, de préférence comprise entre 0,75 M et 1,5 M, plus préférentiellement encore à une concentration égale à 1 M.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé conforme à 35 l'invention, les virus recombinants infectieux gagnent en stabilité quand la solution aqueuse utilisée présente un pH basique compris entre 8 et 9, et de

préférence égal à 8,5.

Ainsi, la solution aqueuse mise en oeuvre dans le cadre de la présente invention peut être une solution tampon choisie parmi le tampon Tris, les solutions triéthanolamine, diéthanolamine, borate/HCl, Glycine / 5 NaOH, EPPS [acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(3-propanesulfonique)], Bicine, TAPS [acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-3-aminopropane sulfonique] et tricine.

Avantageusement, il est possible de stabiliser davantage la capsidé ou l'enveloppe virale des virus conservés selon l'invention en ajoutant à la 10 solution aqueuse utilisée, au moins un sel d'un cation divalent choisi parmi le MgCl<sub>2</sub>, le CaCl<sub>2</sub> et le MnCl<sub>2</sub>, le MgCl<sub>2</sub> étant préféré.

Dans le cadre de la présente invention, le sel de cation divalent est utilisé à une concentration comprise entre 0,1 et 5 mM, de préférence entre 0,5 et 2 mM et encore plus préférentiellement, de l'ordre de 1 mM.

15 Selon un mode de réalisation avantageux de procédé conforme à l'invention, les virus sont conservés dans une solution tampon comprenant un tampon Tris HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5.

On peut encore améliorer la conservation des virus en utilisant au moins un composé stabilisant choisi parmi les sels, de préférence 20 monovalents tels que le NaCl ou le KCl qui procurent une force ionique à la solution, des acides aminés tels que Gly, Leu, Lys, Arg, Asp, Val, Glu et les composés agissant sur la tension de surface tels que le Tween 80 ou le Triton X-100, ces derniers pouvant être utilisés seuls ou en présence de sels.

Avantageusement, à titre de composé stabilisant, le NaCl est utilisé à 25 une concentration comprise entre 0,05 et 1 M, de préférence entre 0,1 et 0,5 M, plus préférentiellement encore entre 0,1 et 0,3 M, la concentration considérée comme optimale étant de 0,15 M, et le Tween 80 est utilisé à une concentration comprise entre 0,001 et 0,5 % en poids par rapport à la solution totale (soit entre 10 mg/l et 5 g/l), de préférence entre 0,002 et 0,2 % en poids et plus préférentiellement encore de l'ordre de 0,005 % en poids.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention met en oeuvre une solution aqueuse de pH environ 8,5 comprenant du Tris-HCl 10 mM, du MgCl<sub>2</sub> 1 mM, du NaCl 0,9 % (ou 150 mM) de Tween 80 50 mg/l (0,05 %) et du saccharose 1 M.

35 De plus, les virus recombinants infectieux conservés selon le procédé conforme à l'invention, peuvent être soumis à une lyophilisation.

L'invention a également pour objet une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux dans une solution aqueuse de saccharose à haute concentration telle que précédemment décrite.

Avantageusement, la suspension aqueuse conforme à l'invention 5 comprend de  $10^6$  à  $10^{13}$  pfu/ml de virus recombinants infectieux.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux telle que ci-dessus décrite ou obtenue par la mise en oeuvre du procédé de conservation conforme à l'invention, en association avec un 10 véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Elle peut être administrée par voie systémique, en particulier par voie sous-cutanée, intraveineuse, intracardiaque, intramusculaire, intrapéritonéale, intragastrique, intratumorale, intrapulmonaire, intranasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou repétée une ou plusieurs 15 fois après un certain délai d'intervalle. La formulation peut également inclure d'autres composés tels qu'un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une composition selon l'invention est, en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que les maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète, myopathie de 20 Duchenne et de Becker, ...), les cancers, les maladies virales (hépatites, SIDA, ...) et les maladies récurrentes (infections provoquées par le virus de l'herpès, le papilloma humain, ...).

Enfin, la présente invention est relative à l'usage thérapeutique ou prophylactique d'une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux 25 telle que ci-dessus décrite ou obtenue par la mise en oeuvre du procédé de conservation conforme à l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. La suspension aqueuse peut être administrée directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire, dans une tumeur accessible, 30 dans les poumons par aérosol, ...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires, ...), de les infecter par la suspension aqueuse de l'invention selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

35 La figure 1 illustre l'influence du pH de la solution de saccharose sur la stabilité virale.

La figure 2 illustre l'influence de l'addition à la solution de

saccharose de Tween 80 et de NaCl. L'unité de l'ordonnée est exprimée en pfu/ml.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lumière des exemples suivants.

5

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les exemples qui suivent mettent en oeuvre un vecteur adénoviral recombinant exprimant soit le gène marqueur *LacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* ou le gène thérapeutique CF codant pour la protéine 10 CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) déficiente chez les patients atteints de mucoviscidose. A titre indicatif, le vecteur est obtenu à partir du génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5) déléte des régions E1 et E3, et comprend, intégrée à la place de la région E1, une cassette pour l'expression du gène marqueur ou thérapeutique (Stratford-Perricaudet et 15 al., 1992, J. Clin. Invest. 90, 626-630 ; Rosenfeld et al., 1992, Cell. 68, 143-155). Il peut être propagé dans la lignée 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72) complémentant la fonction E1 essentielle à la réplication virale. A titre indicatif, la lignée 293 dérive de rein embryonnaire humain et résulte de 20 l'intégration dans ses chromosomes de l'extrémité 5' du génome de l'Ad5 (11 %). Les cellules 293 sont disponibles à l'ATCC (CRL1573) et sont cultivées selon les conditions préconisées par le fournisseur ou dans la littérature.

Un stock viral primaire est constitué de manière conventionnelle dans les cellules 293 transfectées par le vecteur adénoviral décrit ci-dessus. On vérifie la production de particules virales infectieuses recueillies après 25 lyse des cellules par des cycles consécutifs de congélation-décongélation, le titre de la préparation virale par la méthode agar (Graham et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, vol. 7, p 109-128 ; Ed: E. J. Murey, The Human Press Inc.) et l'expression du gène marqueur par coloration au Xgal (4-chloro-5-bromo-3-indolyl- $\beta$ -galactosidase) selon la procédure de Sanes et al. 30 (1986, EMBO J. 5, 3133-3142) ou du gène CF par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques (Dalemans et al., 1992, Experimental Cell Research 201, 235-240). La préparation virale peut être purifiée et concentrée par gradient de densité préalablement à son utilisation.

35 **EXEMPLE 1 :**

#### Influence du pH sur la stabilité du virus

Une suspension virale est préparée de la manière suivante.

Les cellules 293 sont cultivées en CellCube (Costar) dans un milieu GMEM supplémenté avec 7 % de sérum de veau foetal (FCS). Lorsqu'elles atteignent la confluence, elles sont infectées par une aliquote du stock primaire du vecteur adénoviral exprimant le gène CF à une m.o.i.

5 5 (multiplicité d'infection) de 2. Trente heures après l'infection, les cellules qui sont fragilisées, sont détachées par agitation mécanique ou à l'aide d'un agent chimique et récoltées par centrifugation à basse vitesse (3 500 rpm (révolutions par minute) pendant 8 minutes). Elles sont lysées et les particules virales libérées par 3 séries de congélation-décongélation et les

10 10 débris cellulaires éliminés par centrifugation (3 500 rpm pendant 8 minutes). Le virus est purifié à partir du surnageant par deux ultracentrifugations sur chlorure de césum (CsCl), la première sur coussins de CsCl de densité  $d = 1,25$  et  $d = 1,40$  respectivement (141 000 g pendant 2 heures) et la seconde sur un gradient autoformé à partir d'une solution de CsCl de densité  $d = 1,34$ .

15 15 (231 000 g pendant 18 heures).

La bande de virus est récupérée, son titre déterminé ( $2 \times 10^{11}$  pfu) et la préparation est divisée en 4 lots qui sont soumis à une dialyse à 4°C contre 4 fois 250 ml de tampon Tris 10 mM,  $MgCl_2$  1 mM, glycérol 10 %, de pH croissant : pH 7,4, pH 8, pH 8,5 et pH 9 respectivement. La stabilité virale dans 20 20 les différents tampons de formulation est étudiée en parallèle (étude de stabilité accélérée). Pour ce faire, chaque lot est conditionné en cryotubes de 1 ml contenant chacun 100  $\mu$ l de suspension. Les échantillons sont incubés à 37°C et prélevés à  $t_0$  et après 4, 24 et 72 h d'incubation. Ils sont conservés à - 20°C jusqu'au titrage. Le titre viral est déterminé par la méthode agar par 25 25 réinfection de cellules 293 par différentes dilutions de l'échantillon à tester. Les résultats sont donnés en pfu (unité formant des plages)/ml.

Les résultats présentés sur la Figure 1 montrent que la formulation à pH basique préserve l'activité infectieuse des adénovirus. En effet, le titre des préparations formulées dans les tampons à pH 8,5 et 9 sont stables 30 30 pendant 24 heures à 37°C puis diminuent progressivement au cours du temps. En revanche, les virus placés dans un tampon à pH 7,4 et 8 perdent leur pouvoir infectieux dès le début de l'incubation à 37°C. Après 24 heures, les titres sont déjà très bas ( $10^3$  à  $10^4$  pfu/ml contre de l'ordre de  $10^{10}$  au départ) et les virus ne sont pratiquement plus infectieux au bout de 72 heures.

EXEMPLE 2 :Influence de la concentration en Saccharose sur la stabilité du virus

Une suspension virale est préparée comme décrit à l'exemple 1  
5 avec les quelques modifications suivantes :

- les cellules sont infectées par le vecteur adénoviral exprimant le gène *LacZ* ;
- les cellules infectées sont lysées de manière mécanique (homogénéiseur Silverson ; référence L4R) ;
- 10 • les ultracentrifugations en gradient de CsCl sont réalisées à l'aide de rotors à angle fixe (235 000 g pendant 2 h pour la première et 435 000 g pendant 18 h pour la seconde) ;
- la dialyse est remplacée par une étape de chromatographie de filtration sur gel à l'aide de la matrice Trisacryl GF05 LS (Biosepra, référence 259161) 15 permettant un dessalage de la solution par élimination du CsCl ;
- les virus sont formulés dans une solution de Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et saccharose 1 M d'un pH de 8,5 avant d'être répartis en 5 lots par dilution au 1/20 dans les tampons indiqués ci-après et préalablement filtrés sur membrane de porosité 0,22 µm
- 20 Lot 1) Tris-HCl 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM Saccharose 1 M pH 8,5
- Lot 2) Tris-HCl 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM Saccharose 0,75 M pH 8,5
- 1 Lot 3) Tris-HCl 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM Saccharose 0,5 M pH 8,5
- Lot 4) Tris-HCl 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM Saccharose 0,25 M pH 8,5
- Lot 5) Tris-HCl 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM Saccharose 0 M pH 8,5
- 25 Chacun des lots titre au départ environ 10<sup>10</sup> pfu/ml. La stabilité des virus est mesurée en condition accélérée (37°C) sur des aliquotes prélevées régulièrement.

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1

Influence de la concentration en saccharose sur la stabilité du virus à 37°C

5	Titre (pfu/ml) Temps	❶	❷	❸	❹	❺
8 h	1,27 x 10 <sup>10</sup>	1,25 x 10 <sup>10</sup>	1,22 x 10 <sup>10</sup>	1,32 x 10 <sup>9</sup>	2,77 x 10 <sup>6</sup>	
10	24 h	8,5 x 10 <sup>9</sup>	5,02 x 10 <sup>9</sup>	1,47 x 10 <sup>9</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>4</sup>
15	48 h	3,82 x 10 <sup>9</sup>	4 x 10 <sup>7</sup>	3,25 x 10 <sup>6</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>3</sup>
15	72 h	2,37 x 10 <sup>9</sup>	7,5 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>3</sup>
20	1 sem	4,5 x 10 <sup>6</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>2</sup>
20	2 sem	2,5 x 10 <sup>2</sup>	5	<10	<10	<10
20	1 mois	<10	<10	<10	<10	<10

❶ Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Saccharose 1 M, pH 8,5❷ Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Saccharose 0,75 M, pH 8,525 ❸ Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Saccharose 0,5 M, pH 8,5❹ Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Saccharose 0,25 M, pH 8,5❺ Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Saccharose 0 M, pH 8,5

30 De cette étude, il ressort que plus la concentration en saccharose est élevée, plus l'activité virale est préservée (lot 1 plus stable que le lot 2 lui-même plus stable que le lot 3, etc.). En absence de saccharose (lot 5), le pouvoir infectieux chute très rapidement (diminution d'un facteur 5000 dès 8 heures d'incubation). En présence de 0,25 M (lot 4), le titre diminue rapidement mais à un moindre degré (diminution d'un facteur 10 après 8 heures à 37°C). En augmentant encore les concentrations en saccharose (lots 1, 2 et 3), le titre se maintient pendant plus de 8 heures puis décroît progressivement au fur et à mesure de l'incubation. La décroissance est cependant minime lorsque la concentration en saccharose atteint 1M (lot 1).

EXEMPLE 3 :

Etude de la stabilité à long terme dans le tampon de formulation Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5

5 L'étude est réalisée à partir de la suspension virale obtenue à l'exemple 2, dont on étudie la stabilité en conditions long terme à + 4°C et - 20°C. Le titre viral est suivi au cours du temps par titrage agar et les résultats indiqués dans le tableau 2 ci-après montrent une stabilité des préparations virales formulées en présence de saccharose 1 M et à pH 8,5 pendant au moins 6 mois.

10

**Tableau 2**  
Etude de stabilité à + 4°C et - 20°C d'une préparation virale formulée en saccharose 1M.

15

Titres viraux en pfu/ml :

Temps	+ 4°C	- 20°C
t <sub>0</sub>	4,8 x 10 <sup>9</sup>	
1 mois	1 x 10 <sup>10</sup>	9,75 x 10 <sup>9</sup>
2 mois	9,25 x 10 <sup>9</sup>	1,38 x 10 <sup>10</sup>
3 mois	1,32 x 10 <sup>10</sup>	1,05 x 10 <sup>10</sup>
6 mois	1,1 x 10 <sup>10</sup>	1,0 x 10 <sup>10</sup>
1 an	3,7 x 10 <sup>9</sup>	5,0 x 10 <sup>9</sup>

25

30

35

Le tampon de formulation en saccharose 1 M a également été comparé au tampon conventionnel (Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glycérol 10 %, pH 7,4). Cette étude a été menée à + 4°C sur une suspension virale diluée à un titre final d'environ 10<sup>10</sup> pfu/ml dans les 2 types de tampon. Les résultats sont présentés dans le tableau 3 ci-après.

Tableau 3

Etude de la stabilité à + 4°C d'une préparation virale formulée en saccharose 1 M ou en glycérol 10 %

5

10

15

20

25

	Titres viraux en pfu/ml	
Temps	①	②
t = 0	2,5 x 10 <sup>10</sup>	1,0 x 10 <sup>10</sup>
t = 1 mois	ND	1,2 x 10 <sup>3</sup>
t = 3 mois	2,5 x 10 <sup>10</sup>	3,8 x 10 <sup>3</sup>
t = 6 mois	2,6 x 10 <sup>10</sup>	ND

① Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5

② Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glycérol 10 %, pH 7,4

Le titre viral est stable pendant plus de 6 mois à + 4°C lorsque le tampon de formulation comprend du saccharose 1 M et à un pH légèrement basique alors qu'il décroît dès le premier mois lorsque les virus sont placés à pH neutre et en présence de glycérol 10 %.

EXEMPLE 4 :Optimisation du tampon de formulation

La suspension virale obtenue à l'exemple 2 est répartie en 2 lots dilués au 1/20 dans le tampon de formulation utilisé pour le lot 1) non supplémenté ou en présence de Tween 80 50 mg/l (0,005 %) et NaCl 150 mM. La stabilité est analysée à 37°C et à 4°C.

Les résultats de stabilité accélérée (Figure 2) montrent que l'ajout d'agents conservateurs tels que le Tween 80 et le sel améliore encore la stabilité des virus formulés en tampon Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5. L'activité infectieuse se maintient pendant 24 h à 37°C en leur présence au lieu de 8 h en leur absence.

Par ailleurs, la présence des 2 agents conservateurs ne nuit pas à la stabilité de la préparation virale à + 4°C puisque le titre s'avère stable pendant plus de 6 mois.

5 **EXEMPLE 5 :**

Stabilité dans le tampon de formulation Tris-HCl 10 mM,  
MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaCl 0,9 %, Tween 80 50 mg/1 et saccharose  
1 M, pH 8,5.

10 Une suspension virale comme décrit à l'exemple 2 formulée dans une solution de Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM et saccharose 1 M est diluée au 1/20 dans le tampon de formulation suivant :

15 Tris-HCl 10 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1 mM  
NaCl 0,9 % (150 mM)  
Tween 80 50 mg/1  
Saccharose 1 M  
pH 8,5

20 L'échantillon est conditionné en cryotubes de 1 ml, contenant chacun 100 µl de suspension virale. Les cryotubes sont conservés à + 4°C et les titres viraux déterminés à t<sub>0</sub> et régulièrement dans le temps pendant 1 an. Les échantillons sont conservés à - 20°C jusqu'au titrage. Les résultats sont 25 présentés dans le tableau 4 suivant et montrent une stabilité des virus pendant au moins 1 an.

Tableau 4

5

10

15

20

Temps de conservation à 4°C	Titre en pfu/ml
$t_0$	$5,5 \times 10^9$
2 semaines	$5,6 \times 10^9$
1 mois	$23 \times 10^9$
2 mois	$4 \times 10^9$
3 mois	$5,6 \times 10^9$
6 mois	$4,5 \times 10^9$
1 an	$2,5 \times 10^9$

REVENDICATIONS

1 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux sous forme congelée ou liquide, dans lequel les virus sont conservés dans une solution aqueuse comprenant du saccharose à une concentration supérieure à 0,75 M, de préférence comprise entre 0,75 M et 1,5 M, plus préférentiellement à une concentration égale à 1 M.

5 2 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 1, dans lequel les virus sont des adénovirus ou des rétrovirus.

10 3 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le pH de la solution aqueuse est compris entre 8 et 9, de préférence le pH est égal à 8,5.

15 4 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la solution aqueuse est une solution tampon.

20 5 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 4, dans lequel la solution tampon est choisie parmi le tampon Tris-HCl, les solutions triéthanolamine, diéthanolamine, borate / HCl, Glycine / NaOH, EPPS [acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(3-propane sulfonique)], Bicine, TAPS [acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-3-aminopropane sulfonique] et tricine, le tampon Tris-HCl étant préféré.

25 6 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la solution aqueuse comprend en outre au moins un sel d'un cation divalent choisi parmi  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  et  $MnCl_2$ ,  $MgCl_2$  étant préféré.

30 7 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 6, dans lequel le sel de cation divalent est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,1 et 5 mM, de préférence entre 0,5 et 2 mM et encore plus préférentiellement, de l'ordre de 1 mM.

8 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel la solution aqueuse comprend un tampon Tris-HCl 10 mM,  $MgCl_2$  1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5.

35 9 / Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel la solution aqueuse

comprend au moins un composé stabilisant choisi parmi les sels, de préférence monovalents, les acides aminés et les tensio-actifs.

5 10/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 9, dans lequel le sel monovalent est choisi parmi NaCl et KCl, le NaCl étant préféré.

11/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 10, dans lequel le sel monovalent est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,05 et 1 M, de préférence 0,1 et 0,5 M, plus préférentiellement encore entre 0,1 et 0,3 M.

10 12/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 9, dans lequel le tensio-actif est le Tween 80 ou le Triton X-100.

15 13/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 12, dans lequel le Tween 80 est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,001 et 0,5 %, de préférence entre 0,002 et 0,2 %, et plus préférentiellement encore de l'ordre de 0,005 % en poids par rapport à la solution totale.

20 14/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 13, dans lequel la solution aqueuse comprend un tampon Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaCl 150 mM, Tween 80 0,05 % et saccharose 1 M, pH environ 8,5.

15 15/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 14, dans lequel la température de conservation est inférieure ou égale à + 4°C.

25 16/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 15, dans lequel les virus en solution sont ensuite soumis à une lyophilisation.

30 17/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux comprenant une solution aqueuse de saccharose à une concentration supérieure à 0,75 M, de préférence comprise entre 0,75 M et 1,5 M, plus préférentiellement encore égale à 1 M.

18/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 17, caractérisée en ce que les virus sont des adénovirus ou des rétrovirus.

35 19/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 17 ou 18, dans laquelle le pH de la solution aqueuse est compris entre 8 et 9, de préférence le pH est égal à 8,5.

20/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 19, dans laquelle la solution aqueuse est une solution tampon.

5 21/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 20, dans laquelle la solution tampon est choisie parmi le tampon Tris-HCl, les solutions triéthanolamine, diéthanolamine, borate / HCl, Glycine / NaOH, EPPS [acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(3-propanesulfonique)], Bicine, TAPS [acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-3-aminopropane sulfonique] et tricine, le tampon Tris-HCl étant préféré.

10 22/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 21, dans laquelle la solution aqueuse comprend en outre au moins un sel d'un cation divalent choisi parmi  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  et  $MnCl_2$ ,  $MgCl_2$  étant préféré.

15 23/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 22, dans laquelle le sel de cation divalent est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,1 et 5 mM, de préférence entre 0,5 et 2 mM et encore plus préférentiellement, de l'ordre de 1 mM.

20 24/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 23, dans laquelle la solution aqueuse comprend un tampon Tris HCl 10 mM,  $MgCl_2$  1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5.

25 25/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 23, dans laquelle la solution aqueuse comprend au moins un composé stabilisant choisi parmi les sels, de préférence monovalents, les acides aminés et les tensio-actifs.

26/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 25, dans laquelle le sel monovalent est choisi parmi NaCl et KCl, le NaCl étant préféré.

30 27/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 26, dans laquelle le sel monovalent est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,05 et 1 M, de préférence 0,1 et 0,5 M, plus préférentiellement encore entre 0,1 et 0,3 M.

35 28/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 25, dans laquelle le tensio-actif est le Tween 80 ou le Triton X-100.

29/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon

la revendication 26, dans laquelle le Tween 80 est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,001 et 0,5 %, de préférence entre 0,002 et 0,2 %, et plus préférentiellement encore de l'ordre de 0,005 % en poids par rapport à la solution totale.

30/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 29, comprenant de  $10^6$  à  $10^{13}$  pfu/ml de virus recombinants infectieux.

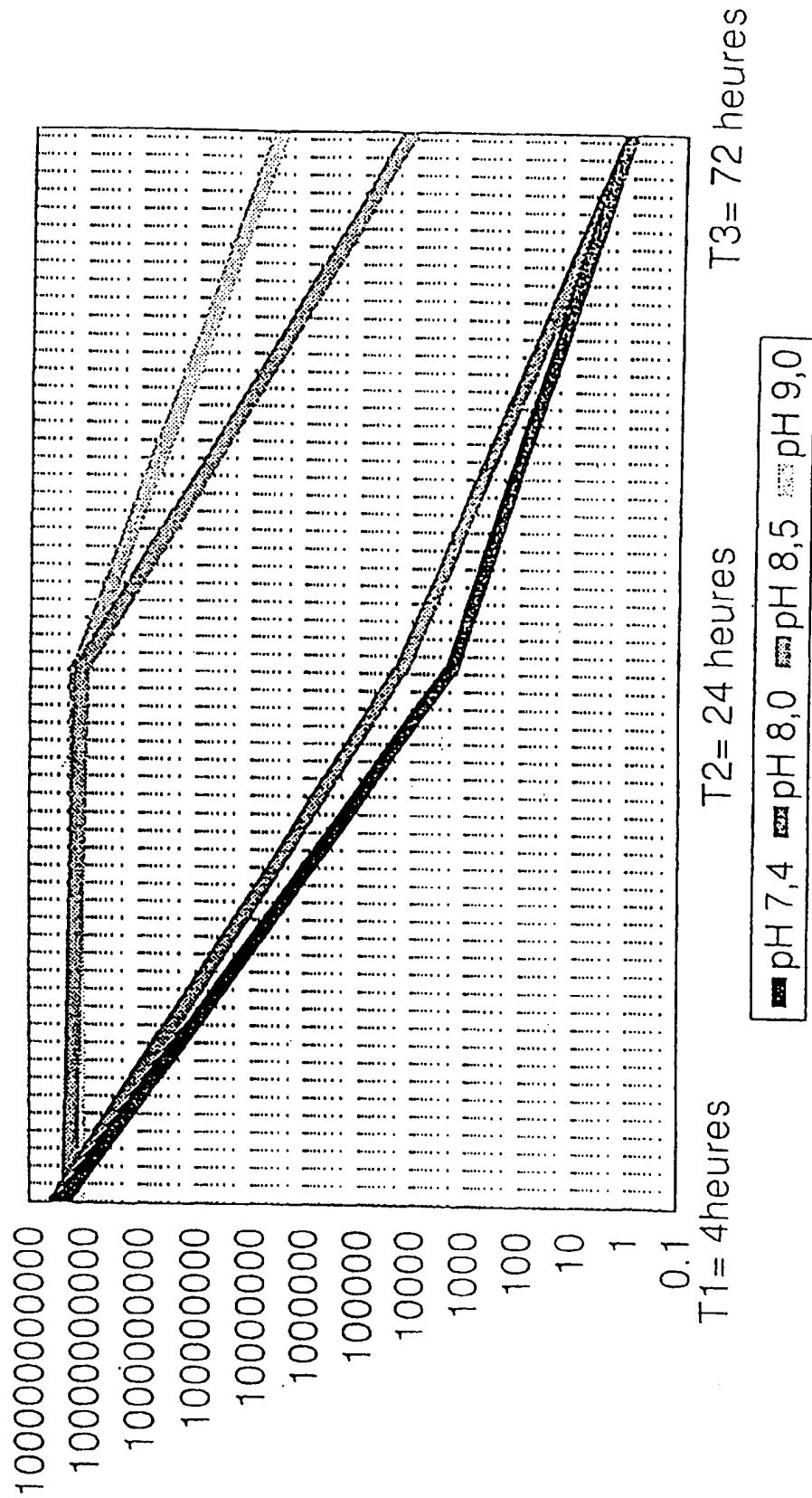
31/ Suspension aqueuse selon la revendication 29, comprenant un tampon Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaCl 150 mM, Tween 80 0,05 % et du saccharose 1M, pH environ 8,5.

32/ Composition pharmaceutique comprenant une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 30, ou obtenue par la mise en oeuvre d'un procédé de conservation des virus recombinants infectieux selon les revendications 1 à 16, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

33/ Usage thérapeutique ou prophylactique d'une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 30, ou obtenue par la mise en oeuvre d'un procédé de conservation des virus recombinants infectieux selon les revendications 1 à 16, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.

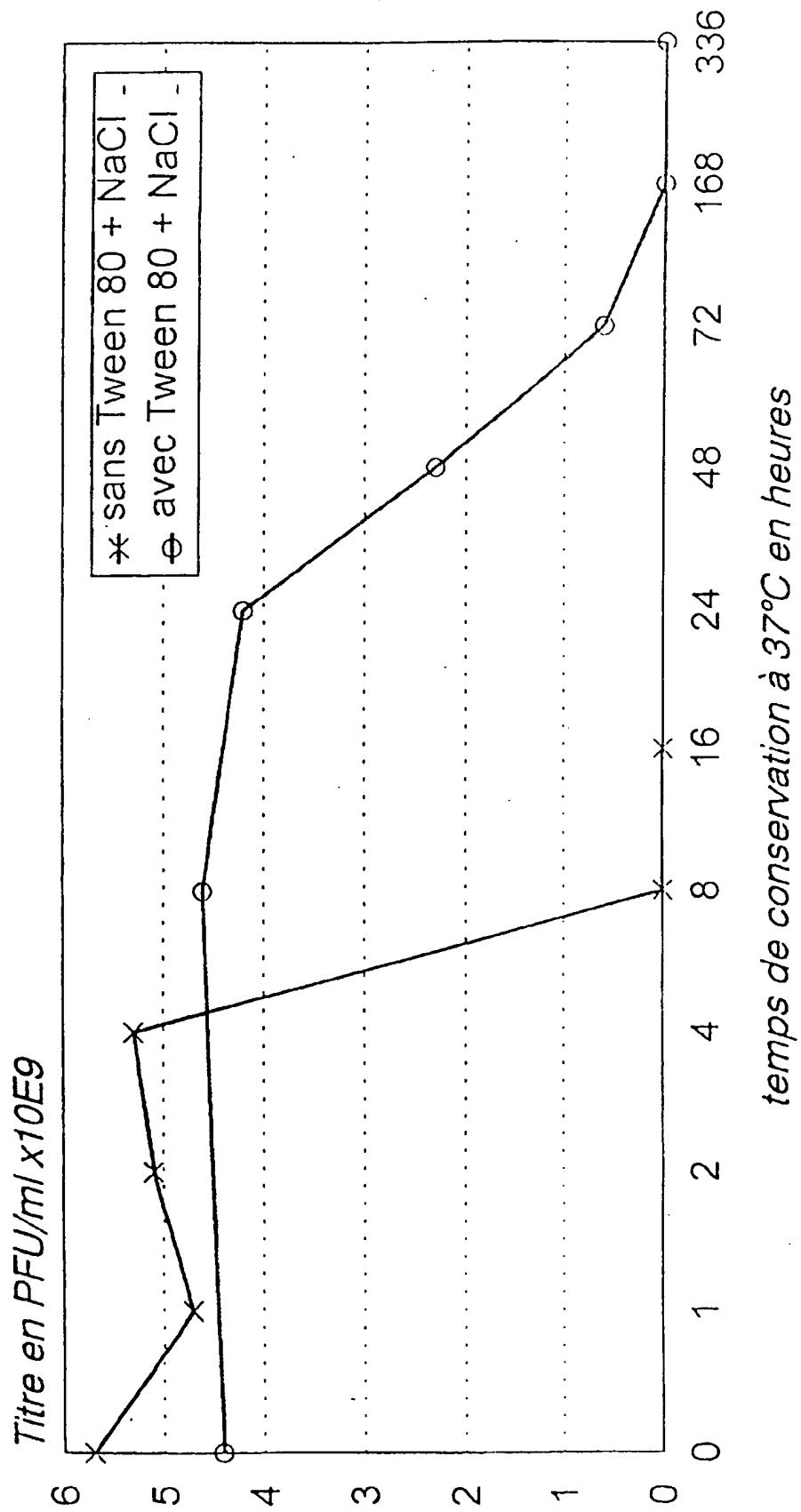
1/2

- Figure 1 -



2/2

- Figure 2 -



## ART 34 AMDT

09/647,518

Claims (19/5/2000)

1. An adjuvant composition comprising a surfactant of formula (I):



wherein,  $n$  is 1-50,  $A$  is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl; and a pharmaceutically acceptable excipient, characterised in that the surfactant of formula (I) is in the form of an aqueous solution or a micelle.

2. An adjuvant composition comprising a surfactant of formula (I):



wherein,  $n$  is 1-50,  $A$  is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl; and a pharmaceutically acceptable excipient, characterised in that the surfactant of formula (I) is not in the form of a vesicle and also in that the adjuvant composition does not comprise an acrylic acid polymer.

3. An adjuvant composition as claimed in claim 1 or claim 2, wherein the adjuvant composition does not comprise an oil-in-water or water-in-oil emulsion.

4. An adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 3, characterised in that the surfactant of formula (I) is haemolytic.

5. An adjuvant composition comprising a surfactant of formula (I):



wherein,  $n$  is 1-50,  $A$  is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl; and a pharmaceutically acceptable excipient, characterised in that the surfactant of formula (I) is not in the form of a vesicle and also in that the degree of haemolytic activity is in the range of 0.05-0.0001% as measured in the Guinea Pig blood haemolysis assay.

6. An adjuvant as claimed in claim 4 or claim 5, wherein the surfactant of formula (I) has a haemolytic activity within a ten fold difference to that of polyoxyethylene-9 lauryl ether or polyoxyethylene-8 stearyl ether, as measured in the Guinea Pig blood haemolysis assay.

7. An adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 6, comprising a surfactant of formula (I), wherein  $n$  is 4 to 24.

8. An adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 7, comprising a surfactant of formula (I), wherein  $R$  is  $\text{C}_{8-20}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{8-20}$  alkyl.

9. An adjuvant composition comprising a surfactant of formula (I):

leads on  
surfactant in  
H2O

Sub  
a1

Sub  
a2



wherein,  $n$  is 9,  $A$  is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl; and a pharmaceutically acceptable excipient, characterised in that the surfactant of formula (I) is not in the form of a vesicle.

10. An adjuvant composition as claimed in claim 8, wherein  $R$  is  $\text{C}_{12}$  alkyl.

11. An adjuvant composition comprising a surfactant of formula (I):



wherein,  $n$  is 8,  $A$  is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl; and a pharmaceutically acceptable excipient, characterised in that the surfactant of formula (I) is not in the form of a vesicle.

12. An adjuvant composition as claimed in claim 11, wherein  $R$  is  $\text{C}_{18}$  alkyl.

13. An adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 12, comprising a surfactant of formula (I), wherein  $A$  is a bond, thereby forming an ether.

14. An adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 12, comprising a surfactant of formula (I), wherein  $A$  is  $-\text{C}(\text{O})-$ , thereby forming an ester.

15. An adjuvant composition as claimed in claim 1, wherein the polyoxyethylene ether or ester of formula (I) is selected from the group comprising: polyoxyethylene-9-lauryl ether, polyoxyethylene-9-lauryl ester, polyoxyethylene-9-stearyl ether, polyoxyethylene-8-stearyl ether polyoxyethylene-4-lauryl ether, polyoxyethylene-35-lauryl ether, polyoxyethylene-23-lauryl ether.

16. An adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 15, wherein the concentration of the surfactant is in the range 0.1-10%.

17. An adjuvant composition as claimed in claim 16, wherein the concentration of the surfactant is in the range 0.25-1%.

18. An adjuvant combination, comprising an adjuvant comprising a surfactant of formula (I):



wherein,  $n$  is 1-50,  $A$  is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl; and a pharmaceutically acceptable excipient, characterised in that the surfactant of formula (I) is not in the form of a vesicle; and at least one additional immunostimulant selected from the group comprising: LT, CT, 3D-MPL, CpG, and QS21.

Sub A 3  
Sub A 4

3  
See also p. 1

19. An adjuvant combination, comprising an adjuvant as claimed in any one of claims 1 to 17, in combination with at least one additional immunostimulant.

20. An adjuvant combination as claimed in claim 19, wherein the at least one additional immunostimulant is selected from the group comprising: LT, CT, 3D-MPL, CpG, and QS21.

20. An adjuvant composition as claimed in claim 19, wherein the CpG adjuvant is: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (SEQ ID NO. 1).

21. An adjuvant composition as claimed in any one of claim 1 to 20, further comprising a vehicle, said vehicle comprising of any one of the following group: chitosan or other polycationic polymers, polyactide and polylactide-co-glycolide particles, particles composed of polysaccharides or chemically modified polysaccharides, or particles composed of glycerol monoesters.

22. A vaccine composition comprising an adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 21, further comprising an antigen or antigenic composition.

23. A vaccine as claimed in claim 22, wherein the antigen or antigen composition is derived from the group comprising: Human Immunodeficiency Virus, Varicella Zoster virus, Herpes Simplex Virus type 1, Herpes Simplex virus type 2, Human cytomegalovirus, Dengue virus, Hepatitis A, B, C or E, Respiratory Syncytial virus, human papilloma virus, Influenza virus, Hib, Meningitis virus, Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia, Bordetella, Streptococcus, Mycoplasma, Mycobacteria, Haemophilus, Plasmodium or Toxoplasma, IgE peptides such as the starworth decapeptide; or Tumor associated antigens (TMA), MAGE, BAGE, GAGE, MUC-1, Her-2 neu, LnRH, CEA, PSA, KSA, or PRAME.

24. A vaccine as claimed in claim 22 or 23, wherein the vaccine is in the form of an aerosol or spray.

25. Use of a surfactant of general formula (I):



wherein, n is 1-50, A is a bond or  $\text{C}(\text{O})-$ , R is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl, wherein the surfactant of formula (I) is not in the form of a vesicle; in the manufacture of a medicament for application onto a mucosal surface or the skin of a patient.

26. Use of an adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 21, in the manufacture of a medicament for application onto a mucosal surface or the skin of a patient.

27. Use of a surfactant of general formula (I) as claimed in claim 25, characterised in that the final medicament does not comprise an acrylic acid polymer.

28. Use of a surfactant of general formula (I) as claimed in claim 25, characterised in that the final medicament does not comprise an oil-in-water or water-in-oil emulsion.

29. Use of polyoxyethylene-9 lauryl ether or polyoxyethylene-8 stearyl ether in the manufacture of a medicament for application onto a mucosal surface of a patient.

30. A spray device, more particularly a bi-dose spray device, filled with a vaccine, characterised in that the vaccine comprises: (a) a surfactant of general formula (I):  
$$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$$
wherein, n is 1-50, A is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ , R is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl; (b) a pharmaceutically acceptable excipient; and (c) an antigen or antigenic composition.

31. Use of vaccine composition as defined in any of claims 22 to 24, for the manufacture of a vaccine for the treatment of viral, bacterial, parasitic infections, allergy, or cancer.

32. A method of treating a mammal suffering from or susceptible to a pathogenic infection, or cancer, or allergy, comprising the administration of a safe and effective amount of a vaccine composition according to any of claims 22 to 24 to the mammal.

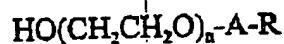
33. A method of treating a mammal suffering from or susceptible to a pathogenic infection, or cancer, or allergy, comprising the mucosal administration of a safe and effective amount of a vaccine composition according to any of claims 22 to 24.

34. A method of treating a mammal suffering from or susceptible to a pathogenic infection, or cancer, or allergy, comprising the intranasal administration of a safe and effective amount of a vaccine composition according to any of claims 22 to 24.

35. A process for making a vaccine composition according to any one of claims 22 to 24, comprising admixing (a) an adjuvant composition as claimed in any one of claims 1 to 21, (b) a pharmaceutically acceptable excipient, and (c) an antigen or antigenic composition.

*Ch* 36. A vaccine or adjuvant as claimed in any one of claims 1 to 24; for use as a medicament.

37. An vaccine composition comprising an adjuvant composition, a pharmaceutically acceptable excipient and an antigen or antigenic composition; wherein the adjuvant composition consists of a surfactant of formula (I):



wherein,  $n$  is 1-50,  $A$  is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl.

which is present in the form of a non-vesicular solution or suspension. Another embodiment of the present invention takes the form of a vaccine adjuvant comprising a surfactant of formula (I), formulated in the absence of cholesterol.

5 Vaccines and adjuvant formulations of the present invention comprise molecules of general formula (I):



wherein,  $n$  is 1-50,  $A$  is a bond or  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$  alkyl or Phenyl  $\text{C}_{1-50}$  alkyl.

10 One embodiment of the present invention consists of a vaccine formulation comprising a polyoxyethylene ether of general formula (I), wherein  $n$  is between 1 and 50, preferably 4-24, most preferably 9; the  $R$  component is  $\text{C}_{1-50}$ , preferably  $\text{C}_4\text{-C}_{20}$  alkyl and most preferably  $\text{C}_{12}$  alkyl, and  $A$  is a bond. The concentration of the polyoxyethylene ethers should be in the range 0.1-20%, preferably from 0.1-10%, and most preferably in the range 0.1-1%. Preferred polyoxyethylene ethers are selected from the following group: polyoxyethylene-9-lauryl ether, polyoxyethylene-9-stearyl ether, polyoxyethylene-8-stearyl ether, polyoxyethylene-4-lauryl ether, polyoxyethylene-35-lauryl ether, and polyoxyethylene-23-lauryl ether.

15

20 A further embodiment of the present invention consists of a vaccine composition comprising a polyoxyethylene ester of general formula (I), wherein  $n$  is between 1 and 50, preferably 4-24, most preferably 9;  $R$  is  $\text{C}_{1-50}$ , preferably  $\text{C}_4$  to  $\text{C}_{20}$  alkyl and most preferably  $\text{C}_{12}$  alkyl, and  $A$  is  $-\text{C}(\text{O})-$ . The concentration of the polyoxyethylene ester should be in the range 0.1-20%, preferably from 0.1-10%, and most preferably in the range 0.1-1%. Preferred polyoxyethylene esters are selected from the following group: polyoxyethylene-9-lauryl esters, polyoxyethylene-9-stearyl esters, polyoxyethylene-8-stearyl esters, polyoxyethylene-4-lauryl esters, polyoxyethylene-35-lauryl esters, and polyoxyethylene-23-lauryl esters.

25

30 Also forming an embodiment of the present invention are vaccine compositions comprising polyoxyethylene phenyl ethers of general formula (I), wherein  $n$  is